Über Gallenfarbstoffe und ihre Auffindung.

Von dem w. M. Prof. **E. Brücke.**

Im December vorigen Jahres machte Dr. Valentiner in Günzburg's Zeitschrift bekannt, dass sich aus Gallensteinen, aus der Galle, ferner aus den Lebern der Icterischen, oft auch aus anderen Geweben derselben mittelst Chloroform eine krystallinische Substanz erhalten lasse, welche verschieden von den bisher bekannten Gallenfarbstoffen sei und in allen ihren Eigenschaften mit dem Hämatoidin übereinstimme. Die chloroformige Lösung gab mit Salpetersäure in besonders schöner Weise die bekannte Farbenfolge der Gmelin'schen Gallenprobe; dagegen „enthielt nach Entfernung der in Chloroform löslichen Farbstoffe die immer noch stark dunkelgrün pigmentirte Galle kein Substrat der Gallenpigmentreaction mehr". Dr. Valentiner schlägt desshalb vor, da, wo es sich darum handelt, kleine Mengen von Gallenfarbstoff in einer Flüssigkeit nachzuweisen, diese mit Chloroform anhaltend zu schütteln und letzteres nach wieder erfolgter Trennung direct mit Salpetersäure zu prüfen.

Da ich in meinen Vorlesungen gerade von der Galle handelte, so machte ich mich sogleich, als jene interessanten Beobachtungen zu meiner Kenntniss gelangten, daran, die Krystalle darzustellen, theils um sie in der Vorlesung zeigen zu können, theils um zu meiner eigenen Belehrung Dr. Valentiner's Versuche mit denselben zu wiederholen. Ich schüttelte den Inhalt von einer Anzahl menschlicher Gallenblasen mit Chloroform, goss nach erfolgter Trennung die Galle von dem specifisch schwereren, nun gelb gefärbten Menstruum so vollständig als möglich ab, und filtrirte letzteres dann durch ein doppeltes Papierfiltrum, welches den Rest der Galle zurückhielt. Das Filtrat wurde in eine Retorte gegossen und das Chloroform langsam, ohne es sieden zu lassen, im Wasserbade abdestillirt. Der Rückstand

wurde nach dem Erkalten mit Weingeist von 94 Volumprocent Alkohol übergossen; die Krystalle hafteten theils an der Innenseite der Retorte, theils senkten sie sich nach dem Umschütteln mit Weingeist wie rothes Ziegelmehl herab. Der Weingeist wurde abgegossen, die Krystalle so vollständig wie möglich herausbefördert und durch decantiren mit Alkohol und Äther gereinigt.

Die mikroskopische Untersuchung zeigte darauf, dass ihnen keine fremdartige Substanz mehr beigemengt sei.

Abgesehen von einigen von Dr. Valentiner angegebenen Versuchen, welche ich mit den Krystallen anstellte, richtete ich meine Aufmerksamkeit zunächst darauf, ob in der That die durch Chloroform erschöpfte Galle die Farbenveränderungen mit Salpetersäure nicht mehr zeige. Ich dampfte einen Theil der von Chloroform abgegossenen Galle im Wasserbade zum Trocknen ab, pulverte sie, extrahirte sie mit Chloroform, filtrirte dasselbe ab, leerte den Filterrückstand wieder in eine Flasche, übergoss ihn mit neuem Chloroform und fügte dann wieder so viel Wasser hinzu, dass sich die trockene Galle darin löste. Nun extrahirte ich durch Schütteln weiter, indem ich das Chloroform von Zeit zu Zeit erneuerte; es nahm immer weniger Farbstoff auf, die Farbenveränderungen, welche es mit Salpetersäure zeigte, wurden immer schwächer und zuletzt unmerklich. Von der nun abgegossenen Galle wurde eine kleine Quantität mit vielem Wasser verdünnt, der Gmelin'schen Probe unterworfen und zeigte den Farbenwechsel sehr schön. Ich habe den Versuch mehrmals wiederholt und ihn theils in der ursprünglichen von Gmelin angegebenen Form angestellt, theils mit der Modification, welche ich vor zehn Jahren an dieser Probe angebracht habe und welche darin besteht, dass nur verdünnte Salpetersäure hinzugesetzt wird und dann concentrirte Schwefelsäure, welche sich zu Boden senkt und von unten her den Zersetzungsprocess einleitet, so dass man sämmtliche Farben gleichzeitig in über einander liegenden Schichten beobachten kann. Stets erhielt ich dasselbe positive Resultat.

Diese Thatsache war in offenem Widerspruche mit Dr. Valentiner's Angabe, und es fragte sich, wie ich sie erklären sollte. Die durch Chloroform erschöpfte Galle bildete mit Wasser grüne Lösungen, dieselben wurden auch durch Zusatz von Kali nicht gelb, sondern nur ein wenig mehr gelbgrün, durch Salzsäure mehr blaugrün.

Ich vermuthete desshalb, dass vielleicht von den beiden als Biliphäin und Biliveridin bekannten Farbstoffen, welche Object der Gmelinschen Probe sind, der eine, das Biliphäin, in Chloroform löslich sei, der andere nicht, und es lag desshalb nahe, zu untersuchen, ob nicht die aus dem Chloroform erhaltenen Krystalle krystallisirtes Biliphäin oder doch eine krystallisirte Verbindung des Biliphäins seien. Es würde dies ihre von Dr. Valentiner vertheidigte Identität mit dem Hämatoidin keineswegs ausschliessen. Virchow hat schon vor eilf Jahren auf die Analogien mit dem Biliphäin (Cholepyrrhin) aufmerksam gemacht, welche ihm sein Hämatoidin bei Einwirkung gewisser Reagentien darbot [1]).

Ich stellte desshalb zunächst eine neue Quantität von Krystallen dar, löste sie, nachdem sie gereinigt waren, in Ammoniak, und fügte dann so viel verdünnte Chlorwasserstoffsäure hinzu, dass die Flüssigkeit sauer reagirte. Sie trübte sich, und beim Umschütteln sammelte sich die Trübung in gelb-bräunlichen Flocken, von denen beim Filtriren die Flüssigkeit vollkommen farblos abtropfte. Diese Flocken erschienen unter dem Mikroskope mit gelber Farbe durchscheinend und vollständig amorph. Rasch mit destillirtem Wasser ausgewaschen, zeigten sie in ihrem Verhalten gegen Reagentien die Eigenschaften des Biliphäins, wie dieselben seit langer Zeit und am genauesten durch die Untersuchungen von Heintz bekannt sind [2]).

---

[1]) Virchow kommt zu dem Resultate, dass sein Hämatoidin vom Biliphäin verschieden sei; indessen sagt er, dass die Unterschiede zwar nach dem jetzigen Stande der Chemie schon zu einer Unterscheidung genügen; aber dass sie keine absoluten sind, sondern mehr auf Verschiedenheit in der Cohäsion zurückführen, ja dass sogar eine ausserordentlich grosse Ähnlichkeit zwischen beiden Farbstoffen nicht weggeleugnet werden kann. Er findet es schliesslich am wahrscheinlichsten, dass der Blutfarbstoff sich allmählich in Gallenfarbstoff umwandele, und das Hämatoidin ein Glied in der Reihe dieser Umwandlungs-Producte sei. (Arch. f. path. Anat. Bd. I, S. 421 ff.)

[2]) Ein Unterschied zeigte sich darin, dass sie beim Kochen mit Alkohol denselben viel weniger tief färbten, als dies frühere Beobachter beschreiben; da sie sich aber gegen kaustische und kohlensaure Alkalien, gegen Chlorbarium, gegen Salpetersäure, gegen Chlorwasserstoffsäure, gegen den Sauerstoff der Atmosphäre etc. ganz wie Biliphäin verhielten, so muss man wohl annehmen, dass das früher dargestellte Biliphäin irgend eine Beimischung enthielt, welche entweder selbst färbende Kraft besass, oder die an sich geringe Löslichkeit des Biliphäins in kochendem Alkohol vermehrte.

Ingleichen absorbirten ihre alkalischen Lösungen Sauerstoff aus der Luft und färbten sich grün von gebildetem Biliverdin.

Es handelte sich nun darum, zu untersuchen, ob die Krystalle durch das Auflösen in Ammoniak und das Fällen mittelst Salzsäure eine chemische Veränderung erlitten hatten, oder ob sie sich durch blosses Auflösen des Biliphäins in Chloroform und Abdampfen desselben wieder gewinnen liessen. Gleich der erste Versuch entschied für das letztere. Da das amorphe Biliphäin verbraucht worden war, um sein Verhalten gegen Reagentien zu prüfen, so löste ich eine neue, grössere Quantität von Krystallen in Ammoniak, fällte mit Chlorwasserstoffsäure, filtrirte und wusch aus. Es hatte sich während der Operation ein Theil des Biliphäins in Biliverdin umgewandelt, so dass der Filterrückstand grünlich gefärbt war. Ich brachte ihn unmittelbar nach dem Auswaschen und noch feucht in Chloroform, worin ich ihn unter Schütteln und gelindem Erwärmen auflöste. Die Flüssigkeit war gelb-grün gefärbt, als ich sie aber filtrirte, wurde sie gelb. Auf dem Grunde des Filtrums blieb ein grüner Beschlag zurück, während der Rand desselben, in den sich die chloroformige Lösung unter Verdunsten des Menstruums infiltrirt hatte, orangegelb gefärbt war. Also nur das Biliphäin war im Chloroform gelöst, das Biliverdin mechanisch darin vertheilt gewesen.

Von der gelben Lösung wurde das Chloroform abdestillirt, den Rückstand fand ich fast seiner ganzen Masse nach wieder krystallinisch, nur ein sehr kleiner Theil des Biliphäins war amorph geblieben.

Kehren wir zu dem Ausgangspunkte unserer Versuche, zur Gmelin'schen Gallenfarbstoffprobe zurück, so sehen wir aus dem obigen, dass das vom Dr. Valentiner empfohlene Chloroform zwar ein vortreffliches Mittel ist, um das eine ihrer Objecte, das Biliphäin, zu extrahiren, dass dagegen das andere, das Biliverdin, nicht durch Chloroform erlangt wird, weil es sich in demselben nicht auflöst. Aber eben dadurch besitzen wir nunmehr im Chloroform ein Mittel

---

Ich muss hiezu bemerken, dass der nach dem Abdestilliren des Chloroforms auf den Retortenrückstand gegossene Weingeist sich immer tief braun färbte und beim langsamen Verdampfen an der Luft ausser Cholesterin und wenig Biliphäin schwarzbraune Massen ausschied. Hier war also durch den Weingeist ein mit dunkelbrauner Farbe löslicher Stoff entfernt worden, der vielleicht bei früheren Versuchen ganz oder theilweise mit dem Biliphäin gemengt blieb.

nicht nur mit Leichtigkeit das Biliphäin rein darzustellen, sondern auch aus einem Gemenge von Biliphäin und Biliverdin das erstere auszuziehen und so das letztere zu reinigen. Umgekehrt kann man dem Biliphäin einen Gehalt an Biliverdin durch Weingeist entziehen, in dem letzteres sich leicht löst, während das Biliphäin darin schwer löslich ist. Man kann auch reines Biliverdin so aus den rothen Krystallen darstellen, dass man sie in wässerigem kohlensaurem Natron löst und die Lösung an der Luft Sauerstoff absorbiren lässt, wie dies Heintz bei seiner Darstellung des Biliverdins mit der Lösung des aus Gallensteinen gewonnenen amorphen Biliphäins gethan hatte, endlich mit Salzsäure fällt, das Filtrat auswäscht und einen etwaigen Rest von Biliphäin mittelst Chloroform auszieht.
